

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-247966

⑪ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)11月5日

G 01 N 33/545

B-7906-2G

33/543

G-7906-2G

// A 61 K 39/00

8214-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 抗原-抗体反応測定用試薬

⑮ 特 願 昭60-89777

⑯ 出 願 昭60(1985)4月25日

⑰ 発 明 者 杉 村 睦 之 摂津市一津屋2-21-21 ダイキン工業江風寮  
⑱ 発 明 者 小 泉 舜 川西市湯山台2-31-6  
⑲ 発 明 者 清 水 哲 男 茨木市新郡山2-27-104  
⑳ 出 願 人 ダイキン工業株式会社 大阪市北区梅田1丁目12番39号 新阪急ビル

# 明 細 書

## 1. 発明の名称

抗原-抗体反応測定用試薬

## 2. 特許請求の範囲

1. 蛋白質を吸着させた担持率1.42以下の含フッ素高分子を分散質としたラテックスからなる抗原-抗体反応測定用試薬。

2. 蛋白質が、ガンマグロブリン、絨毛性ゴナドトロピン、胸腺核蛋白、チログロブリン、抗原性蛋白抗体、抗フィブリノーゲン及び抗ガンマグロブリン抗体から選ばれた1種である特許請求の範囲第1項記載の抗原-抗体反応測定用試薬。

3. 含フッ素高分子の担持率が1.38以下である特許請求の範囲第1項記載の抗原-抗体反応測定用試薬。

4. 含フッ素高分子が、テトラフルオ<sup>ル</sup>エチレンとヘキサフルオ<sup>ル</sup>プロペンおよび/またはパーフルオアルキルビニルエーテルとの共重合体である特許請求の範囲第1項記載の抗原-抗体

反応測定用試薬。

5. 含フッ素高分子が、フッ化ビニリデンとヘキサフルオプロペンおよび/またはテトラフルオ<sup>ル</sup>エチレンとの共重合体である特許請求の範囲第1項記載の抗原-抗体反応測定用試薬。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、免疫血清学的診断に用いるのに有効な抗原-抗体反応測定用試薬に関するものである。(従来の技術)

ラテックスに抗原又は抗体を吸着させ、これを用いて血清中の対応する抗体又は抗原を、抗原-抗体反応に基づくラテックスの凝集反応として検出する免疫血清学的診断法は、その簡便性と迅速性の故に臨床検査の分野において広く行なわれている。

この目的に使用されるラテックスとしては、ポリスチレン又はスチレンとステレンスルホン酸、アクリル酸、アクリル酸エステル、メタクリル酸、メタクリル酸エステル、アセトニトリル等との共

重合体等からなるラテックスが知られている。また該ラテックスを用いた場合の測定方法としては凝集反応を黒い紙上で行い目視観察によるか、又は分光光度計を用いた分光学的方法による定量的方法が用いられている。

(発明が解決しようとする問題点)

ポリスチレン等の炭化水素からなる高分子は屈折率が高く、水との屈折率の差が大きいため、ラテックスそれ自体の濁度が高い。したがって、これらのラテックスを使用して凝集反応を行う分光学的な定量法では、濁度の変化が極めて小さいことがある。そのため濁度と<sup>15</sup>度の対応関係が得られにくく、定量的に問題があった。

本発明の目的は、被検物質を分光学的方法により、容易に定量できる抗原-抗体反応測定用試薬を提供することにある。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、前記のような欠点を生ぜしめないラテックスについて研究を重ねた結果、含フッ素高分子ラテックスが透明性に優れ、抗原-抗体

クスに使用した場合ラテックスの透明度が高いことを発見した。

本発明で使用する含フッ素高分子ラテックスは、水性媒体中で、上記の含フッ素オレフィンを乳化重合又は乳化共重合させて得られる水性分散体であり、ラテックス粒子の平均径は $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$ で、特に $0.03 \sim 0.3 \mu\text{m}$ のものが好適であるが、ポリフッ化ビニリデンのような比較的屈折率が高い( $1.42$ )のものや、安定性のよいラテックスを必要とする場合は、 $0.03 \sim 0.1 \mu\text{m}$ のような小さい平均粒径をもつものが好ましい。なお、ラテックス中には、ラテックスを製造する際に加えられた乳化剤及びその他の添加剤が存在するが、一般的に遊離その他の操作により除去することが好ましく、そのあと試薬調製のため各種安定剤、緩衝剤等が添加される。

次に前記のラテックスに、抗原(又は抗体)となる蛋白質を懸濁させる方法について説明する。一般的には懸濁は、前記ラテックスと抗原(又は抗体)となる蛋白質の水溶液とを混合することにより

反応測定用試薬として優れた性質を有することを発見し、本発明を完成した。

本発明に使用される含フッ素高分子ラテックスの含フッ素高分子とは、テトラフルオールエチレン、ヘキサフルオールプロピレン、トリフルオールエチレン、クロロトリフルオールエチレン、フッ化ビニリデン及びフッ化ビニルの如きフルオールオレフィンの単重合体(ただしポリテトラフルオールエチレンを除く)または共重合体、これらフルオールオレフィンとエチレン、プロペン及びフルオールアルキルエチレンの如きオレフィンおよび/またはフルオールビニルエーテルとの共重合体等であり、屈折率が $1.42$ 以下、好ましくは $1.38$ 以下のものである。ラテックスの凝集反応を分光学的方法により測定しようとする場合、ラテックスの透明度が高いことが望まれる。ラテックスの透明度を高めるためには、水の屈折率( $1.33$ )との差が小さい高分子を分散質として用いる必要があり、本発明者らは、上記の含フッ素高分子の屈折率が他の炭化水素からなる高分子に比べて小さく、ラテッ

よって選ばれるものであるが、好適な製造方法としては、次の方法を用いることが推奨される。すなわち、抗原(又は抗体)となる蛋白質を、 $\text{pH } 7 \sim 9$ の $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液に溶解してタンパク質濃度を $0.001 \sim 1\%$ とする。これをラテックスと混合後、 $20 \sim 37^\circ\text{C}$ で $1 \sim 2$ 時間放置することにより、蛋白質をラテックス粒子に吸着させる。放置後ラテックス粒子は沈降する。上澄み液は除去し、沈降液にさらに $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液を混合して上澄み液を取り除く操作を3回繰り返す。この操作によってラテックスに吸着されなかった蛋白質は大部分取り除くことができる。これは、含フッ素高分子ラテックスの比重大きいので、このような分離操作が可能なのであって、従来使用されていた低比重大のポリスチレン等の炭化水素系ラテックスの場合は、同じ目的のために遠心分離器にかける必要がある。その場合、ラテックスは、しばしば再分散しにくいまでに凝集する。含フッ素高分子ラテックスを用いることにより、このような遠心沈降操作を省くことができることも本発明の特徴で

也。

以上の操作によって、ラテックスに抗原（又は抗体）が吸着し、抗原-抗体反応測定用試薬ができる。

本発明においてラテックスに溶解させる蛋白質としては、ガンマーグロブリン、絨毛性ゴナドトロピン、胸腺核蛋白、チログロブリン、抗反応性蛋白抗体、抗ファイブリノーゲン抗体、抗ガンマーグロブリン抗体等があげられる。

次に、本発明の試薬を用い抗原-抗体反応を測定するには、前記操作により抗原（又は抗体）を沈澱させた本発明の試薬と被検液を混合し、その結果起る凝集反応を検知すればよい。すなわち被検液中に対応する抗体（又は抗原）が含まれている場合、抗原-抗体反応により凝集反応が起こる。この凝集反応は、試薬と被検液の混合液における濁度の変化としてとらえることができるから、分光光度計にて、この濁度を一定波長における吸光度として測定する。すなわち、吸光度の増加により被検液中の抗体（又は抗原）を定量することができる。

量34のガラスファイニングオートクレーブに脱イ  
オン及び脱<sup>脱</sup>した水1.5g、パラフィンワック  
ス（融点58℃）60g、分散剤としてH（CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>）  
COONH<sub>4</sub> 9gを仕込み、オートクレーブ中の空気を  
N<sub>2</sub>ガスで<sup>脱</sup>置換する。そのあとヘキサフル  
オルプロペンを6.5kg/cm<sup>2</sup>Gになるまで圧入する。  
この間に、温度を<sup>30</sup>℃に調節する。テトラフル  
オルエチレンで8.0kg/cm<sup>2</sup>Gになるまで昇圧し、攪  
拌速度を300rpmに設定する。脱いて過硫酸アン  
モニウム1gを含む水溶液15ccを添加し、反応を  
開始する。反応進行中内圧が8.0kg/cm<sup>2</sup>Gに保た  
れるようにテトラフルオルエチレンを連続供給し、  
又、釜内のヘキサフルオルプロペン濃度が65~75  
モル%になるように間欠的に、ヘキサフルオルプ  
ロペンを供給する。さらに4時間おきに、過硫酸  
アンモニウム0.2gを添加する。35時間後攪拌を  
停止し、モノマーを放出後反応を停止する。ポリ  
マー濃度30.1重量%の共重合体ラテックスが得  
られた。得られたポリマーをフィルム状に<sup>成</sup>形し、  
ブツペ型膜厚測定器（温度20℃、Dラング使用）

可能である。この定量は契機には次のようにして  
行うことができる。

まず、抗体（又は抗原）を一定量含有する標準試料を用いて、これを種々の倍率で稀釈した●●●相対標準試料を用意して、対応する抗原（又は抗体）を吸着させた本発明の試薬と混合し反応させる。その反応混合物を●●●●●光路長10mmのセルに入れ、分光光度計を用いて、一定波長の光を照射し、その散光度を測定する。この結果をもとに、抗体（又は抗原）の濃度と吸光度の関係について検量線を作成する。

次に被検液と抗原（又は抗体）を吸着させた本発明の試薬を混合し、前述と同様にして吸光度を測定する。この吸光度と検定量とから、被検液中の抗体（又は抗原）の量を定量することができる。

以下実験例及び比較例により本発明をさらに説明する。

### 实例 1.

アンカー型微粒子を有し、温度調節が可能な容

で測定した結果、ポリマーの屈折率は1.34であった。

得られたラテックスを限外ろ過法により精製した後、このラテックス1容と、ヒトガンマグロブリン1重量%1容を、 $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液( $\text{NaCl}$  0.5 M、 $\text{NaHCO}_3$  0.1 M、PH 8.3)8容に混合させ、1時間室温で放置した。上澄み液を上述の $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液に変える操作を3回繰り返すことにより、未吸着のヒトガンマグロブリンを取り除き、最後にラテックス濃度を1重量%に調整した。

ヒトガンマグロブリンを吸着させた上述の試薬 2 cc を 20 倍に稀釈して、光路長 10 mm のセルに入れ、分光光度計（日立製作所製、556 型）で波長 400 mμ における吸光度を測定すると値は、0.05 であった。次に上述の試薬 2 cc とリウマチ因子を含む血清（日本凍結乾燥研究所社製、リウマチ因子検出用試薬 R A 5 露考陽性血清）0.1 cc を混合させ、混合物を 20 倍に稀釈して同様に吸光度を測定すると値は、0.3 であった。又、対照試験とし

て、上述の試薬2ccとリウマチ因子を含まない血清0.1ccを混合させ、20倍に希釈後、同様に吸光度を測定すると値は、0.06であった。

上記実施例の結果より、被検液にリウマチ因子(抗体)が含まれている場合、吸光度の増加は顕著であり、またリウマチ因子を含まない場合は、吸光度の増加は、ほとんどないことがわかる。

#### 実施例2

実施例1と同様に製造した濃度10重量%のヘキサフルオロアロペソートテトラフルオエチレン共重合ラテックス(以下FEPラテックスと呼ぶ)2ccと、ヒトガンマグロブリン40mgを $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液( $\text{NaCl}$  0.15 M,  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M, pH8.5)に溶解させた液8ccとを混合し、37℃で2時間攪拌してヒトガンマグロブリンをFEPラテックス粒子に吸着させた。次に分散安定剤として、シロキサン1g、塩化コリン0.2 M, アジ化ナトリウム0.1gを含む上記 $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液30ccを加える。その後、静置して、上澄み液を $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液に変える上述の操作を3回繰り返すことにより、未

反応であった。

実施例2のFEPラテックスの代わりに、上記のポリスチレンラテックスを用いて、実施例2と同様な操作を行ない、吸光度と抗ヒトガンマグロブリン濃度の関係を添付図面に示した。ただし、未反応ヒトガンマグロブリンを取り除く際、遠心分離器(26,000 Gを加圧)を使用した点と、最後にポリスチレンラテックス濃度を0.03重量%に調整した点が実施例2と異なる。このようにポリスチレンラテックス濃度をFEPラテックス濃度(1.2重量%)に比べ薄くしたのは、無添加状態における吸光度を同程度にするためである。

図面に見られるとおり、実施例2(FEPラテックス試薬)の場合、抗体の量と吸光度の相関関係が顕著に表われているが、比較例(ポリスチレンラテックス試薬)の場合、相関関係が弱く、特に抗体の量が微量な場合、吸光度の増加は、ほとんど認められない。

#### (発明の効果)

本発明のラテックスは透明性に優れ、抗

血清のヒトガンマグロブリンを取り除いた。最後に、 $\text{NaHCO}_3$ 緩衝液で、FEPラテックス濃度を1.2重量%に調整した。

ヒトガンマグロブリンを数層させた上記試薬1.5ccと、種々の濃度の抗ヒトガンマグロブリン1.5ccを混合させ、分光光度計にて波長600nmにおける吸光度をそれぞれ測定し、吸光度を縦軸とし、抗ヒトガンマグロブリン濃度を横軸として、グラフを繪くと添付図面の如き関係がえられた。

#### 比較例

アンカー型攪拌器を有し、温度調節可能な容量500ccの四つ口セパラブルフラスコに脱イオンした水200ccを入れ、スチレン50g、スチレンスルホン酸0.5gを溶解した水溶液10ccを入れる。攪拌速度を300rpmにし、温度を70℃にした後、 $\text{N}_2$ 置換し続ける。この状態を保ちながら、過硫酸アンモニウム0.3gを溶解した水溶液10ccを加えて反応を開始させる。12時間後、攪拌及び $\text{N}_2$ 置換を停止して反応を終了する。得られたポリスチレンラテックスは濃度15重量%で、平均粒径は0.2μ

m、抗体反応による濃度変化が鮮明で、分光学的定量が容易に可能であり、抗原-抗体反応測定試薬として優れた性質を有する。

#### 4. 図面の簡単な説明

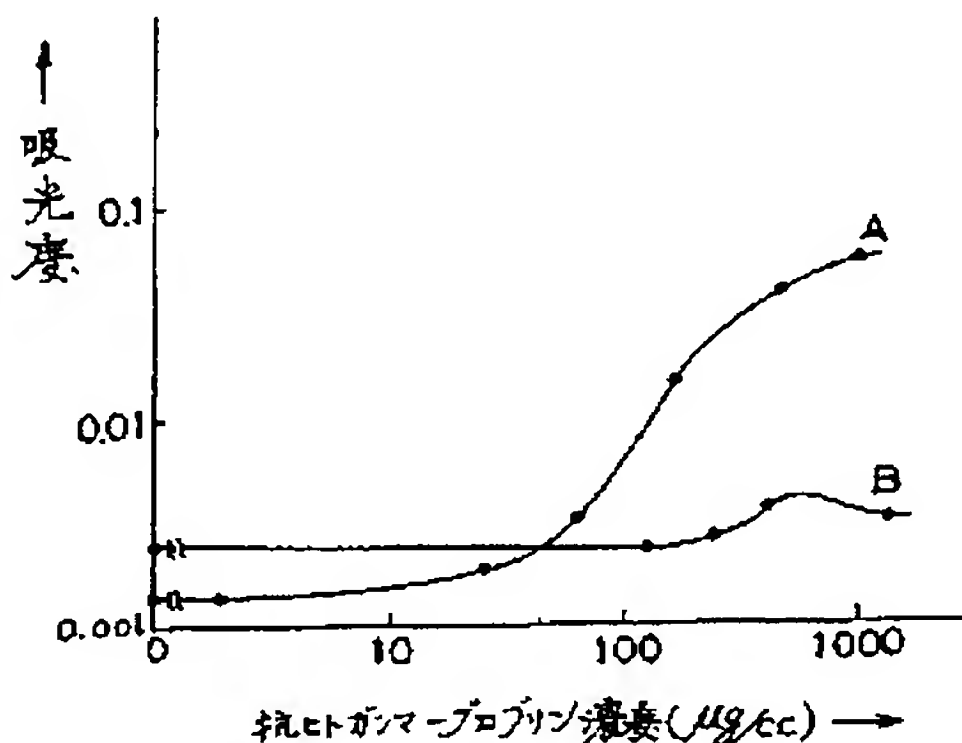
図は実施例2および比較例の結果、すなわち吸光度と抗体の量(濃度)の関係をグラフに表わしたものである。グラフ中Aは、FEPラテックスを用いた本発明の試薬、Bは比較例のポリスチレンラテックスを用いた試薬の結果をそれぞれ表わしている。

以上

手続補正書(自発)

昭和61年4月2日

特許庁長官 予賀 道郎 殿



1. 事件の表示

昭和60年特許第89777号

2. 発明の名称

抗原-抗体反応測定用試薬

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 大阪市北区梅田1丁目12番39号

新阪急ビル

名称 (285) ダイキン工業株式会社

代表者 山田 隆



4. 補正命令の日付

自 発

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書第4頁第6行~第7行の「フッ化ビニリデン及びフッ化ビニルの如き」を「フッ化ビニリデン、フッ化ビニル及びフルオールアルキル(メタ)アクリレート」の如き」と補正する。

(2) 明細書第4頁第11行~第12行の「フルオルビニルエーテル」を「フルオールアルキルビニルエーテル」と補正する。

(3) 明細書第6頁第4行の「 $H = HCO_2$ 」を「 $NaHCO_2$ 」と補正する。

(4) 明細書第8頁第20行の「アンカー型攪拌器」を「アンカー型攪拌機」と補正する。

以 上